

MONO CONFIRM TEST

Per l'identificazione di *Listeria* spp. e la conferma di *Listeria monocytogenes*

DESCRIZIONE

Mono Confirm Test è un micrometodo basato su 4 reazioni biochimiche, per l'identificazione delle colonie di *Listeria* spp. isolate da campioni alimentari, ambientali e la differenziazione di *Listeria monocytogenes* dalle altre specie del genere *Listeria*. I substrati specifici sono essiccati in micropozzetti di plastica; il kit fornisce 12 strisce, ciascuna con otto pozzetti: con una striscia è possibile esaminare 2 ceppi coltivati su terreni selettivi per *Listeria* o su terreni al sangue d'uso generale. Il genere *Listeria* è differenziato dagli altri batteri Gram positivi o Gram negativi per mezzo dei seguenti test: β -glucosidasi, produzione di acidi dall'arabitol e dall' α -metil-D-glucoside; *L.monocytogenes* è identificata attraverso la determinazione di uno specifico enzima, una aminopeptidasi comune a tutte le specie non patogene di *Listeria* ed assente in *L. monocytogenes*.

CONTENUTO DEL KIT

- 12 strisce da 8 pozzetti, per eseguire 24 identificazioni; con i substrati essiccati nei pozzetti è possibile eseguire i seguenti test:

POZZETTO	TEST	SUBSTRATO CONTENUTO NEL POZZETTO
A o E	produzione di acidi dall'arabitol (ARA)	D – arabitol
B o F	produzione di acidi dall' α - metil D-glucoside (MEGLU)	α - metil - D – glucoside
C o G	β - glucosidasi (X-GLUPY)	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranoside
D o H	aminopeptidasi (AMP)	aminoacil - β - naftilamide

- o Supporto per strip, munito di coperchio
- o Dimetilaminobenzaldeide, soluzione al 5% in acido cloridrico 10%, 4 ml
- o 24 pipette con bulbo
- o Standard Mc Farland n° 2
- o Istruzioni per l'uso
- o Foglio per trascrivere i risultati

MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO NEL KIT

- o Inoculation Fluid (24 provettine -codice 524510)
- o Provette da 2-3 ml
- o Tampone di fibra sintetica o di cotone sterili
- o Soluzione fisiologica sterile
- o Incubatore

CAMPIONE

Il campione per l'esecuzione del test è costituito da colonie isolate su terreno di coltura.

IMPIEGO

1. Prelevare colonie pure dal terreno selettivo per *Listeria* (escluso Mac Bride Agar) o da subcoltura in terreno al sangue d'uso generale (Tryptic Soy Blood Agar, Columbia Blood Agar, ecc.). Eseguire una colorazione Gram, i test della catalasi e dell'ossidasi, la mobilità. I ceppi di *Listeria* spp. appaiono come corti bastoncini Gram positivi, mobili a 25°C ed immobili a 37°C, catalasi positivi ed ossidasi negativi. In accordo alle raccomandazioni ufficiali, è opportuno identificare separatamente 4-6 colonie per piastra, poichè specie differenti di *Listeria* possono coltivare insieme, da uno stesso campione.
2. Preparare una sospensione batterica con le colonie coltivate su terreno selettivo o su agar sangue e tipizzate come descritto al punto precedente, in 1ml di soluzione fisiologica sterile o in una provetta di Inoculation Fluid (cat. n. 524510) con torbidità pari a quella dello standard Mc Farland 2 fornito nel kit, utilizzando da 6 a 8 colonie.
3. Trasferire le strisce necessarie al lavoro d'identificazione sull'apposito supporto.
4. Distribuire 3 gocce di sospensione batterica nei pozzetti delle file A-B-C-D oppure delle file E-F-G-H utilizzando le pipette a bulbo fornite con il kit.
5. Coprire con il coperchio ed incubare a 37°C per 18 - 24 ore
6. Riportare i risultati dei pozzetti delle file A-B-C (oppure E-F-G), che non richiedono aggiunta di reattivo: ARA, MEGLU, X-GLUPY
7. Aggiungere una goccia di reattivo dimetilaminobenzaldeide ai pozzetti della fila D (o H) e riportare i risultati del test AMP
8. Leggere i risultati e procedere all'identificazione in accordo alle indicazioni delle tabelle che seguono
9. Nel caso il supporto plastico delle strisce ed il coperchio debbano essere riutilizzati, lavarli con soluzione disinfettante

LETTURA DEI RISULTATI

TEST	COLORE REAZIONE POSITIVA	COLORE REAZIONE NEGATIVA
Arabitol (ARA)	paglierino	blu o verde blu
Metil-glucoside (MEGLU)	paglierino	blu o verde blu
Beta-glucosidase (X-GLUPY)	blu – azzurro	incolore
aminopeptidasi (AMP)	giallo (dopo aggiunta di dimetilaminobenzaldeide)	incolore (dopo aggiunta di dimetilaminobenzaldeide)

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

ARA	MEGLU	X-GLUPY	AMP	IDENTIFICAZIONE
-	-	-	*	Non- <i>Listeria</i> sp.
-	+	+	*	Non- <i>Listeria</i> sp.
-	-	+	*	Non- <i>Listeria</i> sp.
-	+	-	*	Non- <i>Listeria</i> sp.
+	-	-	*	Non- <i>Listeria</i> sp.
+	-	+	*	Non- <i>Listeria</i> sp.
+	+	-	*	Non- <i>Listeria</i> sp.
+	+	+	+	<i>Listeria non monocytogenes</i>
+	+	+	-	<i>Listeria monocytogenes</i>

* Quando anche uno solo dei test ARA, MEGLU, X-GLUPY è negativo, la lettura del test AMP è ininfluente, poiché è esclusa la presenza di *Listeria*.

CONTROLLO QUALITA'

Se si desidera effettuare un controllo di qualità del kit, utilizzare come ceppo positivo *L.monocytogenes* ATCC 13932 oppure ATCC 19111 e come ceppo negativo *L.innocua* ATCC 33090.

LIMITI DEL METODO

Il test deve essere effettuato solo su colonie prelevate da un terreno selettivo solido per *Listeria* (es. ALOA, PALCAM, Oxford). Per l'esecuzione del test non sono idonei i terreni non selettivi ed il terreno Mc Bride Selective Agar.

PERFORMANCE

Le performance del kit sono state valutate su 156 ceppi di *L.monocytogenes* strains e su 77 ceppi di *Listeria* "non *monocytogenes*". Tutti i ceppi di *Listeria* "non *monocytogenes*" sono stati correttamente identificati a livello di genere; tutti i ceppi di *L.monocytogenes* sono stati identificati a livello di genere e differenziati dai ceppi di *Listeria* "non *monocytogenes*".

AVVERTENZE

- 1) Il reattivo dimetilaminobenzaldeide si presenta di colore giallo chiaro limpido
- 2) I substrati essiccati nei pozzetti si presentano con i seguenti colori: pozzetti A-E verde-blu, pozzetti B-F blu, pozzetti C-G incolori, pozzetti D-H incolori.
- 3) Nel caso di marcati cambiamenti di colore del reattivo o dei pozzetti eliminare il prodotto e consultare il nostro servizio assistenza tecnica

PRECAUZIONI E SICUREZZA DEGLI OPERATORI

- 1) Il kit contiene il reattivo dimetilaminobenzaldeide classificato come Xn (nocivo) ai sensi della legislazione vigente; consultare la scheda di sicurezza prima dell'uso.
- 2) L'insieme dei 4 pozzetti contenuti nella piastra non sono riutilizzabili né frazionabili.
- 3) Il kit qui descritto è solo per uso diagnostico *in vitro* ed è destinato ad un ambito professionale. Deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- 4) Sterilizzare i materiali inoculati con materiali patologici dopo l'uso e prima dell'eliminazione come rifiuto.

CONSERVAZIONE

Conservare il kit a 2°-8°C ed impiegarlo entro la data di scadenza riportata in etichetta. Conservare la piastra nella confezione originale, tenuta chiusa, a 2-8°C. Eliminare se vi sono segni evidenti di deterioramento.

BIBLIOGRAFIA

- Avoyné, C., Butin, M., Delaval, J., Bind, L. (1995) Etude de la spécificité d'une méthode rapide pour l'identification de *Listeria monocytogenes* : le Mono Confirm Test., Lait, 76, 405-411, 1996
- Cantoni, C., Ottaviani, F., Carozzi, F., (1994) Evaluation of a new miniaturized system for *Listeria monocytogenes* identification: Mono Confirm Test. Ind. Alim. XXXIII, 1103.
- Lachica R.V. (1990) Same day identification scheme for colonies of *Listeria monocytogenes*. App. Environ. Microbiol., 56, 1166.
- Ottaviani, F., (1994) Mono-Confirm: a miniaturized system for *Listeria monocytogenes* confirmation. 3ème Conférence Internationale ASEPT, Laval, 1-2 Juin 1994.
- Rocourt, J., Catimel, B (1985) Caractérisation biochimique des espèces du genre *Listeria*. Zbl. Bakt. Hyg., A260, 221

CONFEZIONE

193000 Mono Confirm Test, 24 tests

Materiale ausiliario
524510 Inoculation Fluid 24 provette